

29.08.0

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 8月30日

出願番号
Application Number: 特願2002-254973
[ST. 10/C]: [JP2002-254973]

REC'D 17 OCT 2003

WIPO

PCT

出願人
Applicant(s):

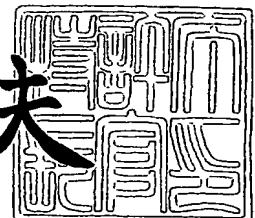
セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社
第一製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02-1063

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61P 3/10
C12N 09/50
C12Q 01/37

【発明の名称】 m-カルパインとHNF-4 α の相互作用阻害剤

【請求項の数】 36

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地
幕張テクノガーデンD棟17階
セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社内

【氏名】 土居 洋文

【発明者】

【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号
第一製薬株式会社 東京研究開発センター内

【氏名】 工藤 玄

【特許出願人】

【識別番号】 500520628

【氏名又は名称】 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000002831

【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088904

【弁理士】

【氏名又は名称】 庄司 隆

【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 m-カルパインと HNF-4 α の相互作用阻害剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合阻害剤。

【請求項 2】 m-カルパインによるヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の分解阻害剤。

【請求項 3】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする HNF-4 α 分解阻害剤。

【請求項 4】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／または m-カルパインによる HNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする HNF-4 α 分解阻害剤。

【請求項 5】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤。

【請求項 6】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／または m-カルパインによる HNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤。

【請求項 7】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用するインシュリン遺伝子のインシュリンの産生促進剤。

【請求項 8】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／または m-カルパインによる HNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用するインシュリン遺伝子のインシュリンの産生促進剤。

【請求項 9】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、HNF-4 α の分解

に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 10】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／または m-カルパインによる HNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 11】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 12】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／または m-カルパインによる HNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 13】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、インシュリンの減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 14】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／または m-カルパインによる HNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、インシュリンの減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 15】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、糖尿病の防止剤および／または治療剤。

【請求項 16】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／または m-カルパインによる HNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、糖尿病の防止剤および／または治療剤。

【請求項 17】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (

HNF-4 α)の結合阻害方法。

【請求項18】 m-カルパインによるヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α)の分解阻害方法。

【請求項19】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α)の相互作用を起こさせないことを特徴とするHNF-4 α 分解阻害方法。

【請求項20】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α)の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とするHNF-4 α 分解阻害方法。

【請求項21】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α)の相互作用を起こさせないことを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法。

【請求項22】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α)の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法。

【請求項23】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α)の相互作用を起こさせないことを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用するインシュリン遺伝子のインシュリンの産生促進方法。

【請求項24】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α)の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用するインシュリン遺伝子のインシュリンの産生促進方法。

【請求項25】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α)の相互作用を起こさせないことを特徴とする、HNF-4 α の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項26】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α)の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α の分解に起因する

疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 27】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 28】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 29】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、インシュリンの減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 30】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、インシュリンの減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 31】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法。

【請求項 32】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法。

【請求項 33】 m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせない化合物の同定方法であって、m-カルパインによるHNF-4 α の相互作用が可能である条件下、化合物を共存させ、m-カルパインとHNF-4 α の相互作用の結果として生じるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存

在若しくは不存在または変化を検出することによる、化合物がm-カルパインとHNF-4 α の相互作用を起こさせないかどうかを決定する方法。

【請求項34】 m-カルパインによるヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の分解を阻害する化合物の同定方法であって、m-カルパインおよび／またはHNF-4 α と化合物を接触させ、HNF-4 α の分解を検出することができるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することによる、化合物がm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害するかどうかを決定する方法。

【請求項35】 請求項33または34に記載の方法によって同定された化合物。

【請求項36】 m-カルパインおよび／若しくはヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α)、またはm-カルパインをコードするポリヌクレオチドおよび／若しくはHNF-4 α をコードするポリヌクレオチド、またはm-カルパインをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターおよび／若しくはHNF-4 α をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターを少なくとも含んでなるキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、m-カルパイン (m-calpain) とヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (Hepatocyte nuclear factor-4 α) (以下、HNF-4 α と略称する) の相互作用を起こさせないこと、例えば、m-カルパインとHNF-4 α の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α の分解に起因する疾患の改善、例えば糖尿病の改善に関する。

【0002】

【従来の技術】

カルパインは、カルシウム依存性システインプロテアーゼであり、蛋白質を限定的に切断してその構造や機能を変化させる酵素である。カルパインは細胞機能

の調節に関与しているため、カルパインの活性制御の不全やその遺伝子の欠損などにより種々の疾患が引き起こされる。カルパインには、構造的特徴、組織局在、およびカルシウム要求性などによって分類される多くのアイソザイムが知られており、これらからなるスーパーファミリーを構成している。

【0003】

m-カルパインは、カルパインスーパーファミリーの1つであり、カルパイン2とも呼ばれ、多くの組織で発現している（生化学 第72巻第11号:1297-1315, 2000）。m-カルパインにより分解される蛋白質として、p53、レチノイドXレセプター（RXR）など多くの転写因子が報告されている（Biochem. Biophys. Res. Commun. 225:946-951, 1996; Mol. Cell. Biol., 17:2806-2815, 1997; Nucleic Acids Res. 21:5092-5100, 1993）。また、m-カルパインが、外傷性脳損傷、アルツハイマー病、脳卒中、および白内障に関与していることが示唆されている（TRENDS in Molecular Medicine, 7:355-362, 2001）。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、m-カルパインと相互作用する蛋白質を見出し、m-カルパインによる当該蛋白質の分解により引き起こされる疾患の防止手段および／または治療手段を提供しようとするものである。

【0005】

【課題解決のための手段】

上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、m-カルパインがHNF-4 α と相互作用することをインシリコ（in silico）で予測して、実験的に証明し、該相互作用の結果、m-カルパインによりHNF-4 α が分解されることを見出して、本発明を完成した。

【0006】

すなわち本発明は、

(1) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α （HNF-

- 4 α) の結合阻害剤、
- (2) m-カルパインによるヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の分解阻害剤、
- (3) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする HNF-4 α 分解阻害剤、
- (4) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／または m-カルパインによる HNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする HNF-4 α 分解阻害剤、
- (5) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤、
- (6) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／または m-カルパインによる HNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤、
- (7) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用するインシュリン遺伝子のインシュリンの産生促進剤、
- (8) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／または m-カルパインによる HNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用するインシュリン遺伝子のインシュリンの産生促進剤、
- (9) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、HNF-4 α の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、
- (10) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／または m-カルパインによる HNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、

(11) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、

(12) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、

(13) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、インシュリンの減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、

(14) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、インシュリンの減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、

(15) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、糖尿病の防止剤および／または治療剤、

(16) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、糖尿病の防止剤および／または治療剤、

(17) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合阻害方法、

(18) m-カルパインによるヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の分解阻害方法、

(19) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とするHNF-4 α 分解阻害方法、

(20) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とするHNF-4 α 分解阻害方法、

(21) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法、

(22) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法、

(23) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用するインシュリン遺伝子のインシュリンの産生促進方法、

(24) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用するインシュリン遺伝子のインシュリンの産生促進方法、

(25) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、HNF-4 α の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

(26) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

(27) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

(28) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF

—4 α) の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF—4 α の分解を阻害することを特徴とする、HNF—4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

(29) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター—4 α (HNF—4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、インシュリンの減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

(30) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター—4 α (HNF—4 α) の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF—4 α の分解を阻害することを特徴とする、インシュリンの減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

(31) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター—4 α (HNF—4 α) の相互作用を起こさせないことを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法、

(32) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター—4 α (HNF—4 α) の結合を阻害すること、および／またはm-カルパインによるHNF—4 α の分解を阻害することを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法、

(33) m-カルパインとヘパトサイト・ヌクレアーファクター—4 α (HNF—4 α) の相互作用を起こさせない化合物の同定方法であって、m-カルパインによるHNF—4 α の相互作用が可能である条件下、化合物を共存させ、m-カルパインとHNF—4 α の相互作用の結果として生じるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することによる、化合物がm-カルパインとHNF—4 α の相互作用を起こさせないかどうかを決定する方法、

(34) m-カルパインによるヘパトサイト・ヌクレアーファクター—4 α (HNF—4 α) の分解を阻害する化合物の同定方法であって、m-カルパインおよび／またはHNF—4 α と化合物を接触させ、HNF—4 α の分解を検出することができるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナル

および／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することによる、化合物がm-カルpainによるHNF-4 α の分解を阻害するかどうかを決定する方法、

(35) 前記(33)または(34)の方法によって同定された化合物、

(36) m-カルpainおよび／若しくはヘパトサイト・ヌクレアーファクター-4 α (HNF-4 α)、またはm-カルpainをコードするポリヌクレオチドおよび／若しくはHNF-4 α をコードするポリヌクレオチド、またはm-カルpainをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターおよび／若しくはHNF-4 α をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターを少なくとも含んでなるキット、
からなる。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明においては、m-カルpainと相互作用する蛋白質を国際公開WO01/67299号公報記載の方法に従ってインシリコ (i n s i l i c o) で予測し、その結果、該蛋白質がHNF-4 α であることを見出した。さらに実験的に、HNF-4 α がm-カルpainと結合すること、さらにHNF-4 α がm-カルpainにより分解されることを初めて見出した。

【0008】

(m-カルpainとHNF-4 α の結合阻害および／またはm-カルpainによるHNF-4 α 分解阻害による関連疾患の防止および／または治療)

HNF-4 α は核内レセプターであり、肝臓、腎臓、小腸、および膵臓の β 細胞で発現していることが知られている。HNF-4 α は転写因子として作用し、種々の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーに結合し、当該遺伝子の転写を活性化する。例えば、膵臓の β 細胞においてHNF-1 α やIPF-1/PDX-1などと転写因子ネットワークを形成すると考えられおり、特にHNF-1 α のポジティブレギュレーター (p o s i t i v e r e g u l a t o r) として機能し、インシュリン、グルコーストランスポーター2 (GLUT2)、およびグルコースキナーゼ (G l u c o s e k i n a s e) などの糖代謝関連遺伝子

の発現を制御している (PNAS 98:14189-14191, 2001; BIO Clinica 17:410-414, 2002; PNAS 94:13209-13214, 1997; Diabetes 50:2472-2480, 2001; Diabetes 51:1409-1418, 2002; Exp. Mol. Med. 30, 33:59-63, 2001; PNAS 94:13209-13214, 1997)。従来、HNF-4 α のインシュリン遺伝子発現に対する作用は、HNF-1 α レベルの上昇を介した間接的なものであると考えられてきた。しかし、HNF-4 α が、インシュリン遺伝子プロモーター内で新規に見出されたシスエレメント (cis element) に結合し、直接的にその発現を調節することが報告された (Bartoov-Shifman, R. et al., J. Biol. Chem., 2002)。

【0009】

HNF-4 α 遺伝子は、遺伝性2型糖尿病MODY1 (Maturity-onset diabetes of the young) の原因遺伝子であることが明らかにされている (J. Mol. Endocrinol. 27:11-29, 2001; 臨床病理 第49巻第2号:161-164, 2001)。さらに、プロモーターのHNF-4 α 結合部位に自然変異を有するヒト遺伝子が、今までに複数同定されている。1つは上述のHNF-1 α をコードする遺伝子である。HNF-1 α プロモーターにおけるHNF-4 α 結合部位の変異により、HNF-4 α がプロモーターに結合せず、その結果HNF-1 α の発現が低減し、遺伝性2型糖尿病MODY3が惹起される (Gagnoli C. et al., Diabetes 46:1648-1651, 1997)。その他に、このような遺伝子として、血液凝固に関与する因子である第VII因子および第IX因子をそれぞれコードする遺伝子が報告されている。第IX因子遺伝子のプロモーターにおけるHNF-4 α 結合部位の変異は、血友病の原因となる (Sladek F. M. et al., In Nuclear Receptors and Genetic Disease:309-361, 2001 Eds. TB Burris & ERB McCabe, San Diego; Academic Press; Marlene J. Reunen et al

., PNAS 89:6300-6303, 1992)。また、第VII因子遺伝子のプロモーターにおけるHNF-4 α 結合部位の変異が、重症第VII因子欠損症(severe factor VII deficiency)の患者で認められている(J. A. Carew et al., BLOOD 15:4370-4372, 2000)。

【0010】

これらから、HNF-4 α の減少や機能欠損は、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の発現を低減させ、その結果、当該遺伝子の遺伝子産物の産生を低下させると考えられる。従って、HNF-4 α の減少や機能欠損は、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する生体機能の異常を引き起こし、さらには、当該遺伝子産物の減少に起因する疾患の原因になると推察される。HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子としては、HNF-4 α の結合部位をプロモーターまたはエンハンサー内に有する遺伝子が例示できる。具体的には、インシュリン遺伝子、HNF-1 α 遺伝子、血液凝固第VII因子遺伝子、および血液凝固第IX因子遺伝子などが挙げられる。

【0011】

本発明において、m-カルパインがHNF-4 α と相互作用すること、その相互作用においてm-カルパインがHNF-4 α と結合してこれを分解することを明らかにした。m-カルパインによるHNF-4 α の分解は、HNF-4 α の減少、またはHNF-4 α の機能消失を引き起こす。従って、m-カルパインとHNF-4 α の相互作用を起こさせないことにより、HNF-4 α の分解を阻害することができる。さらには、HNF-4 α の機能、例えば転写因子としての機能を促進することが可能である。

【0012】

これらに基づいて、本発明は、m-カルパインとHNF-4 α の結合阻害剤、m-カルパインによるHNF-4 α の分解阻害剤、およびHNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤を提供する。当該分解阻害剤および当該産生促進剤は、m-カルパインとHNF-4 α の相互作用を起こさせないことを特徴とする。または、m-カルパインとHNF-4 α の結合を阻害す

ること、および／またはm-カルpainによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする。さらに、本発明は、m-カルpainとHNF-4 α の結合阻害方法、m-カルpainによるHNF-4 α の分解阻害方法、およびHNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法を提供する。当該分解阻害方法および当該産生促進方法は、m-カルpainとHNF-4 α の相互作用を起こさせないこと、またはm-カルpainとHNF-4 α の結合を阻害すること、および／若しくはm-カルpainによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする。

【0013】

さらに、m-カルpainとHNF-4 α の相互作用を起こさせないことにより、m-カルpainによるHNF-4 α の分解に起因する疾患の防止および／または治療が可能である。m-カルpainによるHNF-4 α の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、並びに当該疾患の防止方法および／または治療方法は、m-カルpainとHNF-4 α の相互作用を起こさせないこと、例えば、m-カルpainとHNF-4 α の結合を阻害すること、および／またはm-カルpainによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする。HNF-4 α の分解に起因する疾患としては、例えばHNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患が挙げられる。このような疾患としては、例えば糖代謝関連因子の減少に起因する疾患、例えばインシュリンの減少に起因する疾患などが挙げられる。より具体的には、糖代謝異常による疾患、例えば糖尿病など、あるいは血液凝固第VII因子または第IX因子の欠乏に起因する出血性疾患、例えば血友病や重症第VII因子欠損症などが例示できる。実際、マウスの脾臓ランゲルハンス島にカルpain阻害剤を暴露させるとグルコース刺激によるインシュリン分泌が増加することが報告されている (Seamus K. Sreenan, et al., Diabetes 50:2013-2020, 2001)。しかし、この報告においては、m-カルpainとHNF-4 α の相互作用については開示されていない。

【0014】

(m-カルpainとHNF-4 α の結合およびm-カルpainによるHNF-4

α の分解を阻害する化合物の同定方法)

本発明においては、上記知見に基づいて、m-カルパインと HNF-4 α の相互作用を起こさせない化合物、あるいはm-カルパインと HNF-4 α の結合および／またはm-カルパインによる HNF-4 α の分解を阻害する化合物の同定方法を提供する。該同定方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。化合物の同定に使用するm-カルパインおよび HNF-4 α は、これらを遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または該細胞や生体試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、m-カルパインと HNF-4 α の相互作用、m-カルパインと HNF-4 α の結合および両蛋白質の機能、例えばm-カルパインのプロテアーゼ活性および HNF-4 α の転写因子機能が阻害されなければ、N末端側やC末端側に別の蛋白質やペプチド、例えば β -ガラクトシダーゼ、IgGなどの免疫グロブリンFc断片、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tag、またはXpressなどが、直接的にまたはリンカーペプチドなどを介して間接的に、遺伝子工学的手法などを用いて付加されたものであってもよい。被検化合物としては、例えば化学ライブラリーや天然物由来の化合物、またはm-カルパインおよび HNF-4 α の一次構造や立体構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物などが挙げられる。

【0015】

例えば、m-カルパインおよび／または HNF-4 α の相互作用が可能である条件を選択し、当該条件下で化合物を共存させ、m-カルパインと HNF-4 α の相互作用の結果として生じるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、m-カルパインと HNF-4 α の相互作用を起こさせない化合物を同定できる。ここでシグナルとは、そのもの自体がその物理的または化学的性質により直接検出され得るものを指し、マーカーとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に検出され得るものを指す。シグナルとしてはルシフェラーゼ、グリーン蛍光蛋白質 (GFP)、および放射性同位体など、マーカーとしては、レポーター遺伝子、例えばクロラムフェニコールアセチル

トランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子など、または検出用のエピトープタグ、例えば 6×His-tag など、公知のものが利用できる。これらシグナルまたはマーカーの検出方法は当業者には周知のものである。例えば実施例記載のように、ウェスタンブロットティングなどの自体公知の方法により m-カルpain と HNF-4 α の結合の検出が可能である。

【0016】

あるいは、m-カルpain および／または HNF-4 α と化合物とを接触させ、HNF-4 α の分解を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存または変化を検出することにより、m-カルpain による HNF-4 α の分解を阻害する化合物を同定できる。HNF-4 α の分解の検出は、例えば実施例記載のように、ウェスタンブロットティングなどの自体公知の方法により実施可能である。

【0017】

または、m-カルpain および HNF-4 α を共発現させた細胞を用い、該細胞と化合物とを接触させ、m-カルpain と HNF-4 α の結合または m-カルpain による HNF-4 α の分解を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存または変化を検出することにより、m-カルpain と HNF-4 α の結合および／または m-カルpain による HNF-4 α の分解を阻害する化合物を同定できる。

【0018】

上記細胞を使用した同定方法は、上記インビトロでの同定方法と組み合わせて使用できる。当該インビトロの同定方法により得られた m-カルpain と HNF-4 α の結合および／または m-カルpain による HNF-4 α の分解を阻害する化合物を、細胞を使用した上記同定方法で再度試験することにより、有用な化合物をさらに選択可能である。

【0019】

(m-カルpain と HNF-4 α の結合阻害剤、m-カルpain による HNF-

4 α 分解の阻害剤、および医薬組成物)

上記方法で得られた化合物は、m-カルpainとHNF-4 α の結合阻害剤、m-カルpainによるHNF-4 α の分解阻害剤、および／またはHNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤として利用可能である。このような化合物としては、両蛋白質が相互作用する部位、例えば結合部位のアミノ酸配列からなるペプチドまたはオリゴペプチドを例示できる。特に、m-カルpainの基質となるHNF-4 α 由来のかかるペプチド、例えばオリゴペプチドYKLPG（実施例1および図1を参照）は、両蛋白質の相互作用を競合的に阻害すると考えられる。このようなペプチドまたはオリゴペプチドは、m-カルpainまたはHNF-4 α のアミノ酸配列から設計し、自体公知のペプチド合成法によって合成し、上記同定方法においてm-カルpainとHNF-4 α の結合および／またはm-カルpainによるHNF-4 α の分解を阻害するか否かを試験することにより同定可能である。また、m-カルpainとHNF-4 α の結合を阻害する抗体も上記化合物の1つとして例示できる。該抗体は、例えば両蛋白質自体、または両蛋白質が相互作用する部位のアミノ酸配列からなるペプチド若しくはオリゴペプチドを抗原として自体公知の抗体作製法により得ることができる。

【0020】

上記同定された化合物、上記m-カルpainとHNF-4 α の結合阻害剤、上記m-カルpainによるHNF-4 α の分解阻害剤、および／または上記HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤は、さらに生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することによって、医薬として調製可能である。すなわち、これらは、m-カルpainによるHNF-4 α の分解に起因する疾患、例えばHNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止および／または治療に利用可能である。これらは、単独で使用することもできるし、複数を組み合わせて使用することも可能である。また、これらは試薬として使用でき、例えばm-カルpainとHNF-4 α の相互作用に係る細胞機能などを研究するために有用である。

【0021】

本発明に係る結合阻害剤、分解阻害剤、遺伝子産物の産生促進剤、並びに疾患の防止剤および／または治療剤の処方は、適当な医薬担体と組み合わせて処方することが好ましい。かかる処方は、治療上有効量の上記化合物、上記結合阻害剤、上記分解阻害剤、上記遺伝子産物の産生促進剤、並びに上記疾患の防止剤および／または治療剤に、さらに医薬上許容される担体または賦形剤を含む。かかる担体としては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限らない。処方は投与経路に適したものを選択すればよく、該処方は当業者によく知られている。また、処方するときには、これらを単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物または医薬と一緒に使用してもよい。

【0022】

投与形態は、全身投与であっても局所投与であってもよい。全身投与の好ましい一態様は、注射、例えば静脈注射が挙げられる。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路を用いることもできる。投与の別の態様は、腸溶処方またはカプセル処方がうまく処方されるならば、経口投与も可能である。さらに、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜投与若しくは経皮投与を用いることもできる。局所的な投与においては、膏薬、パスタ、ゲルなどの形態での投与であってもよい。

【0023】

必要な用量範囲は、上記結合阻害剤、上記分解阻害剤、上記遺伝子産物の産生促進剤、並びに上記疾患の防止剤および／または治療剤の有効性、投与経路、処方の性質、対象の症状の性質、および担当医師の判断による。具体的には、適当な用量は、例えば対象の体重 1 kg あたり $0.1 \mu\text{g}$ 乃至 $100 \mu\text{g}$ の範囲である。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

【0024】

製剤化にあたっては、例えばペプチド、蛋白質、オリゴヌクレオチド、抗体、化合物など各対象の物性に応じた公知の製剤化手段を導入すればよい。具体的には、例えば散剤、丸剤、錠剤、カプセル製剤、水溶液製剤、エタノール溶液製剤

、リポソーム製剤、脂肪乳剤、シクロデキストリンなどの包接体などの製剤化方法が利用できる。

【0025】

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロース、マンニトールなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いて製造できる。錠剤やカプセルを製造するには、固体の製薬担体が用いられる。

【0026】

懸濁剤は、水、シュクロース、ソルビトール、フラクトースなどの糖類、PEGなどのグリコール類、油類を使用して製造できる。

【0027】

注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

【0028】

リポソーム化は、例えばリン脂質を有機溶媒（クロロホルムなど）に溶解した溶液に、当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振とう、超音波処理および遠心処理した後、上清をろ過処理して回収することにより行い得る。

【0029】

脂肪乳剤化は、例えば当該物質、油成分（大豆油、ゴマ油、オリーブ油などの植物油、MCTなど）、乳化剤（リン脂質など）などを混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば高圧噴射型や超音波型など）を用いて、乳化・均質化处理して行い得る。また、これを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えばグリセリンや糖類（例えばブドウ糖、ソルビトール、果糖など）が例示される。

【0030】

シクロデキストリン包接化は、例えば当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水などに加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿をろ過し、滅菌乾燥することにより行い得る。この際、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ α 、 β 、 γ 型）を適宜選択すればよい。

【0031】

（キット）

本発明は、m-カルパインおよびHNF-4 α 、またはm-カルパインをコードするポリヌクレオチドおよびHNF-4 α をコードするポリヌクレオチド、またはm-カルパインをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターおよびHNF-4 α をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターを少なくとも含むでなるキットを提供する。当該キットは、例えば本発明に係る同定方法に使用できる。

【0032】

m-カルパインおよびHNF-4 α は、これらを遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または当該細胞や生体試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、m-カルパインとHNF-4 α の結合および両蛋白質の機能、例えばm-カルパインのプロテアーゼ活性やHNF-4 α の酵素基質としての性質に影響がなければ、N末端側やC末端側に別の蛋白質またはペプチド、例えば β -ガラクトシダーゼ、IgGなどの免疫グロブリンFc断片、グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）、His-tag、Myc-tag、Flag-tag、またはXpressなどが、直接的にまたはリンカーペプチドなどを介して間接的に遺伝子工学的手法などを用いて付加されたものであってもよい。

【0033】

m-カルパインまたはHNF-4 α をコードするポリヌクレオチドは、ヒトcDNAライブラリーから自体公知の遺伝子工学的手法により調製することができる。m-カルパインまたはHNF-4 α をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターは、上記ポリヌクレオチドを適当な発現ベクターDNA、例えば細菌

プラスミド由来のベクターに自体公知の遺伝子工学的手法で導入することにより得られる。

【0034】

上記キットは、m-カルパインとHNF-4 α の結合やm-カルパインによるHNF-4 α の分解を検出するためのシグナルおよび／またはマーカー、バッファー、並びに塩など、必要とされる物質を含むことができる。さらに、安定化剤および／または防腐剤などの物質を含んであってもよい。製剤化にあたっては、使用する各物質それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

【0035】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

【0036】

【実施例1】

(m-カルパインと相互作用する蛋白質のインシリコでの探索)

m-カルパインと相互作用する蛋白質を、国際公開第WO01/67299号公報記載の予測方法に従って予測した。すなわち、m-カルパインのアミノ酸配列をある長さのオリゴペプチドに分解し、各オリゴペプチドのアミノ酸配列あるいはそのアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を持った蛋白質をデータベース中で検索し、得られた蛋白質とm-カルパインとの間でローカルアライメントを行い、ローカルアライメントのスコアの高いものをm-カルパインと相互作用すると予測した。

【0037】

解析の結果、m-カルパイン由来の6アミノ酸残基からなるオリゴペプチDFKLPPGと相同性のあるオリゴペプチドYKLLPGが、肝遺伝子の発現を制御することが知られている核転写因子の一つのHNF-4 α のアミノ酸配列中に存在することが分かった。図1aにヒトm-カルパインとヒトHNF-4 α とのローカルアライメントの結果を、図1bにウサギm-カルパインとヒトHNF-4 α とのものを示した。この結果から、HNF-4 α はm-カルパインと相互作用

する蛋白質であると予測された。なお、ウサギm-カルパインについてのNCBIデータベースでの配列情報はヒトm-カルパインの279番目のアミノ酸残基以降しか記載がないが、この領域での同一性は94%であることから、278番目以前のアミノ酸配列についてもヒトm-カルパインとほぼ同等と考えられる。

【0038】

【実施例2】

(ウサギm-カルパインによるHNF-4 α の分解)

m-カルパインがシステインプロテアーゼであることから、HNF-4 α のm-カルパインによる分解をウサギm-カルパインを用いたインビトロ分解試験により確認した。

【0039】

<材料>

HNF-4 α 発現プラスミドを以下のように構築した。まず、ヒトHNF-4 α cDNAを、ヒト肝臓polyA⁺ RNAから逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により獲得し、PCRエラーと思われる塩基置換はQuick Change Site-Directed Mutagenesis kit (STARATAGENE社)により修正した。その後、N末端にHisおよびXpress-tagを付加させる動物細胞用発現プラスミド、pcDNA3.1/His (Invitrogen社)にEcoRIサイトで組み込み、HNF-4 α 発現プラスミドを構築した。クローニングしたHNF-4 α cDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBI蛋白質データベースのアクセッション番号XP_009514 (登録遺伝子名はHNF4A)と同一であった。

【0040】

上記HNF-4 α 発現プラスミドを用い、インビトロでのHNF-4 α 蛋白質の合成を、TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega社)を使用して行なった。すなわち、上記HNF-4 α 発現プラスミドとTNT T7 Quick Master Mixを混合し、メチオニン存在下で30℃にて1.5時間インキュベーションしてHNF-4 α を合成した(以下、TNT/HNF-

4 α という)。

【0041】

<方法>

インビトロにおける蛋白質分解試験は、TNT/HNF-4 α にウサギの筋肉より抽出したm-カルpain (PROTEASE, Calcium Activated Neutral, calpain, Sigma社)を最終蛋白質濃度50 μ g/mLとなるように添加し、200mM Tris-HCl (pH7.8)/1mM DTT/6mM CaCl₂存在下で37℃にて1時間インキュベーションした。また、カルシウム非存在下での分解試験を行なうために、6mM CaCl₂の代わりに10mM EDTAを添加した試料を作製して同様にインキュベーションした。インキュベーション後の試料は、等容量の2 \times SDS サンプルバッファー〔4% SDS/125mM Tris-HCl, pH6.8/20% グリセロール/0.01% ブロムフェノールブルー (BPB)/10% β -メルカプトエタノール (mercaptoethanol)〕を加えて5分間加熱し、10% SDS-PAGEにより分離した。その後、抗HNF-4 α 抗体/C-19 (Santa Cruz Biotechnology社)および抗Xpress抗体 (Invitrogen社)を用いてウェスタンブロットティング法によりHNF-4 α を検出した。検出はECL western blotting detection kit (Amersham Pharmacia Biotech社)を使用して行なった。

【0042】

<結果>

図2に示したように、ウサギm-カルpainによるHNF-4 α の分解が認められた。一方、HNF-4 α はカルシウム非存在下またはm-カルpain無添加では分解されなかった。ウサギm-カルpainとヒトm-カルpainは約94%の高い相同性を有することから、ヒトm-カルpainも同様にHNF-4 α を分解すると考えられる。以上の結果から、HNF-4 α はm-カルpainによりカルシウム存在下で分解されることが明らかとなった。

【0043】

【実施例3】

(m-カルpainとHNF-4 α の結合解析)

m-カルpainとHNF-4 α の結合を、細胞内共発現/免疫沈降法による結合試験により確認した。

【0044】

<材料>

m-カルpain発現プラスミドの構築は以下のように行なった。まず、カルpain cDNAを、ヒト肝臓polyA⁺ RNA (Clontech社) からRT-PCRにより獲得し、PCRエラーと思われる塩基置換はQuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE社) により修正した。その後、C末端にFLAG-tagを付加させる動物細胞用発現プラスミド、pCMV-Tag4 (STRATAGENE社) へSal-Iサイトで組み込み、m-カルpain発現プラスミドを構築した。クローニングしたm-カルpain cDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBI蛋白質データベースのアクセッション番号AAA35645 (登録遺伝子名はCAPN2) と、73番目および74番目のアミノ酸がMRからIEに置換されている以外は同一である。このIEへの置換はSwiss-Prot (P17655) においてコンフリクト (Conflict) の記載がある。

【0045】

<方法>

m-カルpain遺伝子とHNF-4 α 遺伝子をHEK293T細胞に共遺伝子導入し、細胞内での結合を確認した。まず、細胞数 1.3×10^6 のHEK293T細胞を37℃/5%CO₂の条件下で4時間培養した後(60mmシャーレ)、5 μ gのHNF-4 α 発現プラスミド(実施例2で調製したもの)または陰性コントロールとしてpcDNA3.1/Hisプラスミドを5 μ gのm-カルpain発現プラスミドと共に、FuGENE6 Transfection Reagent (Roche社) を用いてトランスフェクションした。2日間培養後、細胞を冷PBS (-) で洗浄し、500 μ lの細胞溶解バッファー[20mM HEPES, pH7.5/150mM NaCl/1mM エチレンジア

ミン四酢酸 (EDTA) / 1% Triton X-100 / 1mM フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)] に懸濁し、氷上で20分間放置した。その後、15krpmで20分間4℃にて遠心処理することにより上清を回収し、細胞溶解物 (cell lysate) とした。次に、採取した cell lysate に、0.1%の牛血清アルブミンを含むTBS (pH8.0) で前処理した Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech社) を18 μ l 添加し、4℃にて2時間転倒混和した後、遠心処理により上清を回収した。回収した上清に抗HNF-4 α 抗体/c-19を0.6 μ g 添加し、4℃で1時間転倒混和後、Protein G Sepharose 4 Fast Flow を20 μ l 加え、さらに4℃で1時間転倒混和した。その後、遠心処理により Protein G Sepharose を回収し、500 μ l の洗浄バッファー (50mM Tris-HCl, pH7.5 / 150mM NaCl / 0.2% NP-40) で3回洗浄した後、30 μ l の2 \times SDS サンプルバッファーを加え、5分間加熱後、上清を10% SDS-PAGEにより分離した。その後、抗FLAG M2抗体 (Sigma社) および抗Xpress抗体を用いてウェスタンブロットティング法により結合蛋白質を検出した。なお、検出はECL western blotting detection kit (Amersham Pharmacia Biotech社) を使用して行なった。

【0046】

<結果>

図3Aに示したように、抗HNF-4 α 抗体による免疫沈降 (図中IPと表示) で、m-カルパイン (FLAG-tag付加) はHNF-4 α (Xpress付加) と共発現させた試料 (図中レーン1) でのみ共沈した。HNF-4 α 非発現細胞ではm-カルパインの共沈降は認められなかったことから、この共沈降はアガロースビーズへの非特異的結合によるものではなく、HNF-4 α とm-カルパインの結合を示すものであることが明らかになった。両試料におけるm-カルパインの発現が同程度であることは、抗FLAG M2抗体によるウェスタンブロットティングの結果から確認された (図3Aのlysate参照)。図3Bは

HNF-4 α 抗体により細胞内のXpress-HNF-4 α が回収されていることを示す。

【0047】

【発明の効果】

本発明では、m-カルパインがHNF-4 α と相互作用すること、その相互作用においてm-カルパインとHNF-4 α が結合してHNF-4 α が分解されることを初めて見出した。HNF-4 α は転写因子であり、種々の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーに結合し、当該遺伝子の転写を活性化する。HNF-4 α が、インシュリンなどの糖代謝関連因子の発現に関与していること、および遺伝性2型糖尿病の原因遺伝子であることが知られていることなどから、HNF-4 α の減少や機能欠損が糖尿病に関与することが推察される。これらから、m-カルパインとHNF-4 α の相互作用を阻害することにより、例えばm-カルパインとHNF-4 α の結合を阻害する、および／またはm-カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することにより、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患、例えばインシュリンの減少に起因する疾患、具体的には糖尿病などの防止および／または治療が可能になる。従って本発明は、HNF-4 α の過剰な分解に起因する疾患の防止および／または治療のために、非常に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 m-カルパインとHNF-4 α の相互作用をインシリコで予測した結果を示す図である。図1aはヒトm-カルパインとヒトHNF-4 α とのローカルアライメントの結果、図1bはウサギm-カルパインとヒトHNF-4 α とのローカルアライメントの結果を示す。

【図2】 m-カルパインが、インビトロでHNF-4 α をカルシウム依存性に分解したことを示す図である。図中の+および-は各組成の有無を示している。図2Aは抗HNF-4 α 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す。また図2Bは抗Xpress抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す。矢頭は、HNF-4 α のバンドを示す。図の左列に記載した数値は、分子量マーカーの分子量である。

【図3】 m-カルパインとHNF-4 α が細胞内で結合することを示す図である。レーン1はm-カルパイン（FLAG-tag付加）とHNF-4 α （Xpress付加）を共発現させた細胞試料、レーン2はm-カルパイン（FLAG-tag付加）のみを発現させた細胞試料である。図1のAおよびBは、それぞれ抗FLAG M2抗体および抗Xpress抗体を用いたウエスタンブロッティング（Blot）の結果を示す。図中、IPは抗HNF-4抗体を用いて免疫沈降を行なったことを、lysateは免疫沈降していない細胞試料を示す。図の左列に記載した数値は、分子量マーカーの分子量である。

【書類名】

図面

【図 1】

a)

475 FKLPPG (ヒトm-カルパイン)

437 YKLLPG (ヒトHNF-4 α)

KL PG

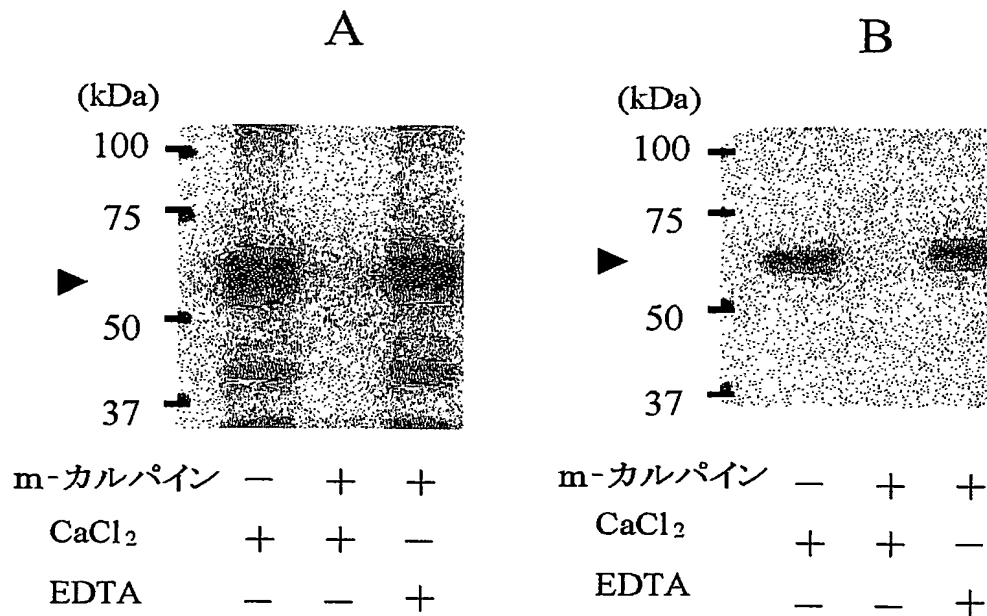
b)

197 FKLPPG (ウサギm-カルパイン)

437 YKLLPG (ヒトHNF-4 α)

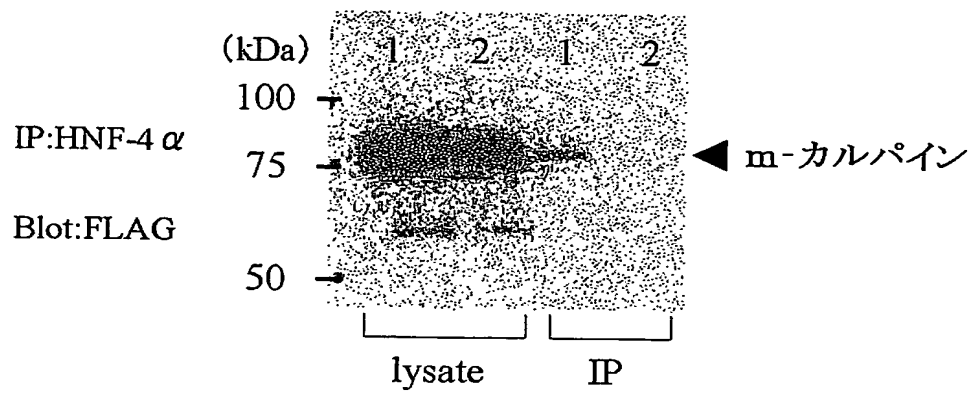
KL PG

【図 2】

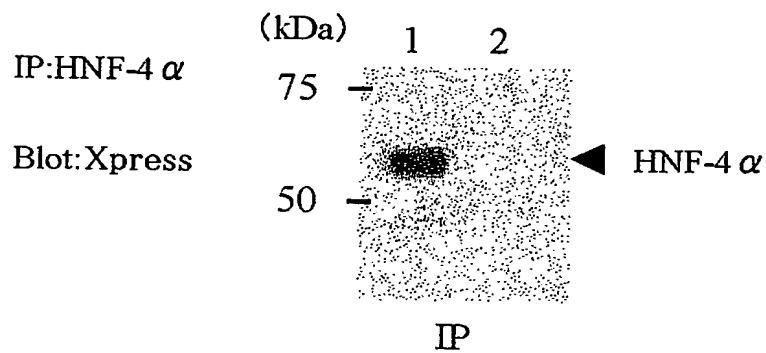


【図 3】

A



B



【書類名】

要約書

【要約】

【課題】 m-カルパインと相互作用するタンパク質の分解により引き起こされる疾患の防止手段および／または治療手段の提供。

【解決手段】 m-カルパインと HNF-4 α の結合阻害剤、m-カルパインによる HNF-4 α の分解阻害剤、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤、HNF-4 α の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、m-カルパインと HNF-4 α の結合阻害方法、m-カルパインによる HNF-4 α の分解阻害方法、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法、HNF-4 α の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、m-カルパインと HNF-4 α の相互作用を起こさせない化合物および／またはm-カルパインによる HNF-4 α の分解を阻害する化合物の同定方法、並びに該同定方法で得られた化合物。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 2 5 4 9 7 3
受付番号	5 0 2 0 1 3 0 0 7 2 6
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 4 年 9 月 2 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成14年 8月30日

次頁無

特願 2 0 0 2 - 2 5 4 9 7 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 0 5 2 0 6 2 8]

1. 変更年月日

2 0 0 0 年 1 0 月 2 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

千葉県千葉市美浜区中瀬 1 丁目 3 番地 幕張テクノガーデン D
1 7

氏 名

セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

特願2002-254973

出願人履歴情報

識別番号

[000002831]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

氏 名

第一製薬株式会社